

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de pathologie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Giulio GABBIANI

PROTEINES CONTRACTILES DANS LES CELLULES CANCEREUSES DU SEIN

(Une étude à l'immunofluorescence et au microscope électronique)

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Jean-Claude SCHNEEBERGER

de

Berne

Thèse No 3553

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de pathologie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Giulio GABBIANI

PROTEINES CONTRACTILES DANS LES CELLULES CANCEREUSES DU SEIN

(Une étude à l'immunofluorescence et au microscope électronique)

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Jean-Claude SCHNEEBERGER

de

Berne

Thèse No 3553

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Giulio Gabbiani, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 29 novembre 1976

Le doyen :
Marcel Jenny

Thèse No 3553



Au nom de Jean-Claude,

je remercie tout particulièrement le professeur G. Gabbiani, qui a été l'instigateur de ce travail et en a dirigé l'élaboration;

je remercie le professeur Y. Kapanci pour son aide et ses conseils.

La réalisation de cette thèse a bénéficié de la collaboration des membres du Laboratoire des biopsies, de celle de Mesdemoiselles M.C. Clottu et M. Flohr du Laboratoire de microscopie électronique, et de celle de Messieurs E. Denkinger et J.C. Rumbeli du Laboratoire de photographie. Qu'ils trouvent ici l'expression de sa reconnaissance.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au professeur G. Gabbiani sans le travail et la sollicitude duquel cette thèse n'aurait pu être publiée.

M.P. Schneeberger

En hommage à JEAN-CLAUDE

L'une des caractéristiques les plus spécifiques de néoplasies malignes est leur tendance à envahir localement, même si la tumeur apparaît circonscrite à l'histologie.

Bien que le mécanisme d'invasion soit loin d'être élucidé, des preuves se sont accumulées suggérant que l'activité motrice des cellules malignes joue un rôle important (1,2,3). Ces dernières années, la présence de protéines contractiles dans de nombreuses cellules non musculaires a été découverte et une relation entre la présence de ces dernières et la motilité cellulaire a été décrite (4,36).

Dans le présent travail, nous avons comparé la quantité et la distribution des protéines dans les cellules mammaires normales et dans les cancers du sein.

Les protéines contractiles les mieux étudiées sont celles du muscle strié; ce sont les mêmes que nous retrouverons au cours de notre étude : il s'agit de l'actine, de la myosine, de la tropomyosine et de la troponine (35). Chacune de ces protéines peut être extraite séparément, mais leur comportement est le résultat des structures hautement organisées qu'elles forment ensemble et de leurs interactions biochimiques.

La fibre musculaire striée est, comme on le sait, entourée d'une membrane cellulaire appelée le sarcolemme. Des myofibrilles disposées longitudinalement, montrant des striations, constituent la fibre. La partie de

chaque myofibrille entre deux disques Z (disque intermédiaire) est le sarcomère, unité de contraction du muscle. Au microscope électronique, on distingue une bande A (composée surtout de filaments épais de myosine) et une bande I, plus claire (composée essentiellement de filaments d'actine plus minces).

Dans la cellule musculaire, les quatre protéines sont assemblées en deux aggrégats multimoléculaires : les filaments épais et les filaments minces. Les premiers sont constitués de myosine, ayant l'apparence d'un petit bâtonnet fin surmonté de deux petites têtes globulaires. La myosine peut être décapitée par un enzyme, qui casse les liens la rattachant au reste de la molécule. Les têtes ainsi obtenues ont la même activité biochimique que le reste de la molécule, mais sont plus faciles à manier dans les expériences. A l'exception d'une zone nue centrale, les molécules de myosine du filament épais sont arrangées dans un étui, développant une structure en forme de cigare, pénétrée perpendiculairement par des projections. Dans les photographies du muscle au ME, des projections apparaissent comme des minuscules ponts reliant les filaments minces et les filaments épais. Apparemment, chaque projection est formée par la tête d'une molécule de myosine. Ces molécules sont réparties en groupe, de façon à laisser apparaître, au centre, une zone "nue". Le filament épais d'un muscle normal mesure approximativement $1,5\mu$ de longueur et contient plusieurs centaines de molécules.

Les trois autres protéines majeures impliquées dans la contraction musculaire sont incorporées dans les filaments minces. De ces trois protéines, l'actine est la plus importante. Les molécules d'actine sont de petites particules grossièrement sphériques, arrangées en un filament mince pour former un double fil enroulé sur lui-même. Les molécules individuelles globulaires d'actine ont une caractéristique importante : elles ne sont pas symétriques.

Chacune d'elle agit comme si elle avait une face avant et une face arrière. Cette caractéristique leur permet d'avoir une polarité, toutes les faces avant étant tournées dans une même direction, toutes les faces arrière se trouvant dans la direction opposée. Cette polarité est essentielle à la contraction musculaire.

En plus de l'actine, les filaments minces du muscle contiennent les protéines tropomyosine et troponine; les tropomyosines sont de longues molécules qui s'attachent bout à bout, formant un brin très mince sur la surface de chaque filament d'actine. Chaque filament contient un brin longitudinal dans le sillon des sphères jumelées. La troponine a une forme plus ou moins globulaire et se situe à côté de la molécule de tropomyosine, probablement près d'une extrémité. Sur le filament mince une molécule de tropomyosine s'étend sur sept sphères d'actine, avec une molécule de troponine sur chaque tropomyosine. Des filaments minces de muscle squelettique ont habituellement 300 à 400 molécules d'actine et peut-être 40 à 60 tropomyosines. Dans le muscle intact une extrémité des filaments minces est attachée à la ligne Z, qui est une structure plate. Les filaments qui ressortent de chaque surface ont une polarité opposée sur chaque côté de la ligne Z. Dans le muscle au repos, les lignes Z qui se succèdent sont séparées par 2,2 microns et les filaments minces sont alignés parallèlement à l'axe long de la fibre musculaire.

Pour compléter l'image du muscle, il faut voir un ensemble de filaments épais dans les espaces entre les filaments minces qui se projettent à partir des lignes Z. Les deux ensembles de filaments sont arrangés dans des lignes parallèles et se superposent sur une partie de leur longueur. L'espacement des filaments est tel que deux ensembles peuvent glisser l'un à côté de l'autre sans restriction. C'est ce mouvement de glissement qui est responsable du raccourcissement dans la contraction musculaire. La force conductrice pour

le glissement vient des ponts croisés sur le filament épais; ils s'attachent au filament mince à un certain angle et ensuite pivotent à un autre angle, tirant ainsi les filaments minces à côté des filaments épais. Les ponts intercroisés sur les côtés opposés des zones nues pivotent dans des directions opposées, comme des rameurs situés face à face dans un bateau. Le résultat de ce mouvement de rame est de rapprocher les filaments pour qu'ils se superposent plus, diminuant la distance entre les lignes Z et raccourcissant ainsi le muscle. Pour qu'un raccourcissement significatif survienne, chaque pont intercroisé doit agir dans un cycle : il doit s'attacher, pivoter, se détacher et s'attacher à nouveau sur un point plus loin sur le filament mince. Un tel cycle complet cause un mouvement relatif de $100 \text{ \AA}$. Ceci veut dire que si tous les ponts suivaient ce cycle une fois, ils raccourciraient le muscle de 1% de sa longueur.

L'énergie pour la contraction musculaire, comme pour tout le travail dans une cellule vivante est fournie par l'hydrolyse d'adénosine triphosphate(ATP). Cette réaction de dégradation dissocie l'ATP qui a beaucoup d'énergie en produits de moindre énergie : l'adénosine diphosphate (ADP) et phosphate inorganique. Cette différence d'énergie entre ces deux composés est le moteur de ce travail, c'est-à-dire de faire pivoter les ponts, tirant ainsi un filament mince le long du filament épais et ayant comme conséquence une contraction musculaire.

Pour cette contraction musculaire, il faut des ions Ca^{++} qui permettent un contrôle du processus. Puisque ces réactions de contraction musculaire (l'attachement et le détachement des ponts intercroisés pour lesquels l'énergie est fournie par l'hydrolyse de l'ATP) n'ont pas lieu en l'absence des ions Ca^{++} , on peut en laboratoire enclencher ou déclencher le processus en ajoutant ou en enlevant les ions Ca^{++} . Cette contraction musculaire est contrôlée de la

même façon dans l'organisme vivant : quand le signal nerveux parvient à la cellule musculaire, il cause une libération de Ca^{++} dans le liquide qui entoure les filaments à partir de vésicules de stockage dans le réticulum sarcoplasmique, ce qui permet aux ponts entre les filaments de s'attacher et la contraction d'avoir lieu. Le Ca^{++} est rapidement retiré et remplacé dans les vésicules de stockage par une pompe à Calcium située dans les membranes du réticulum sarcoplasmique. Le retrait de calcium empêche tout autre cycle des ponts intra-filamentaires et le muscle se relâche. La libération du calcium et son retrait ultérieur sont des processus très rapides qui ne durent qu'une fraction de seconde.

Nous allons retrouver, dans le cytoplasme des cellules non musculaires, les composantes du muscle strié.

Actines cytoplasmiques :

Les propriétés physico-chimiques des actines cytoplasmiques (4) qui ont été investiguées sont presque toutes identiques et ont les mêmes paramètres que l'actine musculaire : dans le muscle, le poids moléculaire de l'actine varie entre 43 000 à 48 000 daltons, dans le cytoplasme, le poids moléculaire de l'actine est d'environ 45 000 daltons. La composition en acides aminés des actines cytoplasmiques et musculaires ne diffèrent que de dix résidus, (notamment l'acide aspartique, la méthionine, l'isoleucine et la leucine). Elles ont été investiguées dans des protozoaires (Acanthamoeba, Dictyostelium), dans le cerveau (de chat, de vache et de rat), dans la bordure en brosse de l'intestin de poulet, ainsi que dans les oeufs d'oursins (4).

Les actines musculaires et cytoplasmiques ont en commun la capacité de se polymériser en filaments. Ceci est une propriété clé, car l'actine peut

transmettre une tension seulement quand elle est organisée en filaments, et seuls les filaments d'actine peuvent activer la myosine ATPase pendant la conversion de l'énergie chimique de l'ATP en travail mécanique.

Au microscope électronique, on peut visualiser les filaments d'actine qui ont une largeur de 5 à 8 nm avec une moyenne de 6 nm. Lors de la polymérisation de l'actine musculaire, l'ATP lié est rapidement converti en ADP et phosphates libres. L'actine du *Physarum*, du cerveau et des plaquettes humaines libère du phosphate lors de la polymérisation.

Interaction avec la myosine :

Comme il a été dit plus haut, la myosine musculaire ou ses fragments protéolytiques se lient aux filaments d'actine provenant du muscle ou du cytoplasme, ce qui donne la même apparence au microscope électronique. Cette observation montre que tous les filaments d'actine ont la même structure hélicoïdale et une même orientation pour les sites de liaison de la myosine.

Toutes les actines cytoplasmiques connues agissent sur l'activité ATPasique de la méromyosine lourde; l'actine plaquettaire humaine active la myosine plaquettaire humaine. Dans le cas de certaines actines, la présence supplémentaire de tropomyosine est nécessaire pour une stimulation de l'activité ATPasique de la myosine.

Avec la technique de Ishikawa (formation de structures en fer de lance ou arrowhead complexes au microscope électronique après glycérisation et traitement à la méromyosine lourde), la présence d'actine a été prouvée in situ dans des macrophages de cobaye, des plaquettes humaines, dans les fibroblastes des embryons de poulet, des fibroblastes du coeur d'embryon de poulet, des fibroblastes de la souris; dans des cellules épithéliales telles

que l'épiderme et l'intestin de l'embryon de poulet, le poumon d'embryon de souris, dans les tubules rénaux, dans des glandes salivaires (de l'embryon de souris), dans la trachée de l'embryon de poulet; dans les tissus nerveux de la glie et des neurones (embryon de poulet), dans les cellules de neuroblastomes (de souris), dans le tissu embryonnaire des oeufs de triton et dans des spermatoocytes; dans des testicules, dans des protozoaires, dans des cellules en culture (Hela) et des cellules tumorales d'ascites d'Ehrlich et dans des plantes (Nitella) (4).

Les techniques immunologiques :

On a découvert que des patients ayant une hépatite chronique agressive avaient des anticorps qui se liaient en cellules musculaires lisses (smooth muscle antibodies ou SMA) (37). Des travaux successifs ont démontré que ces anticorps sont spécifiques pour l'actine. Ces anticorps se fixent aux plaquettes, aux fibroblastes en culture et à l'épithélium de l'intestin, dans les microvillosités de l'épithélium tubulaire du rein, dans les lymphocytes, certaines cellules endothéliales et dans des fibroblastes de tissu en voie de cicatrisation (myofibroblastes) (5, 38).

Myosine :

On accepte actuellement, que ni l'actine, ni la myosine ne sont capables d'engendrer, par elles-mêmes, la force pour le mouvement dans le muscle (4). Ceci suppose, que dans le cytoplasme des cellules non musculaires, l'actine coexiste avec la myosine.

Deux généralités sont déjà ressorties de ces études :

- 1) Toutes les myosines ont en commun avec la myosine musculaire deux facteurs que l'on croit essentiels pour la génération de force dans le muscle, notamment, la capacité de se lier de façon réversible aux filaments d'actine et de posséder une activité ATPasique qui peut être activée par l'actine (4).
- 2) Contrairement aux actines, les myosines cytoplasmiques et musculaires varient considérablement dans leurs propriétés physiques et chimiques (4). La diversité des myosines fait que nous restreignons ce terme à une classe d'enzymes possédant une activité ATPase déclenchable par l'actine qui se lie réversiblement aux filaments d'actine (4). Cette définition, basée sur les propriétés les plus importantes pour la fonction de la myosine pendant sa contraction, laissait quand même une marge pour des considérations de taille et de forme.

La relation entre l'actine et la myosine avec le mouvement cellulaire :

Actuellement, il n'y a aucune preuve expérimentale définitive que l'actine et la myosine engendrent la force pour le mouvement cellulaire, bien que de nombreux arguments supportent cette idée.

Arguments comparatifs : d'abord, les propriétés nombreuses que les actines et les myosines ont en commun plaident pour un mécanisme composé de forces communes (4). Si l'on se rappelle que le cycle de l'interaction de l'actine et de la myosine qui engendre la force dans le muscle est constitué de quatre étapes, à savoir :

- 1) L'hydrolyse de l'ATP par la myosine
- 2) La dissociation des produits de l'hydrolyse lors de la liaison de l'actine à la myosine

3) Le mouvement de glissement

4) La dissociation de l'actine et la myosine par une nouvelle liaison de l'ATP à la myosine,

il est frappant de constater que l'actine et la myosine des cellules non musculaires peuvent parcourir ces 4 étapes in vitro (4) bien que l'on ne sache pas si une telle séquence survient in vivo.

Dans les cellules non musculaires (4):

1) Les myosines peuvent hydrolyser l'ATP

2) L'actine stimule l'hydrolyse de l'ATP par la myosine cytoplasmique

3) Des petits filaments d'actomyosines se contractent en présence d'ATP et de Mg^{++} (bien qu'il ne soit pas prouvé qu'un mécanisme de glissement soit impliqué)

4) L'ATP dissocie l'actine et la myosine cytoplasmique.

Ces ressemblances frappantes avec le muscle strié ne peuvent pas être attribuées au hasard. Il semble plutôt que le muscle et plusieurs autres cellules non-musculaires ont un mécanisme commun qui engendre le mouvement. Cet argument est renforcé par la facilité avec laquelle les actines et les myosines de plusieurs sources ont une interaction. Bien qu'il y ait quelques différences dans les réactions (dont la signification reste à être découverte) toutes les myosines cytoplasmiques peuvent former des hybrides actifs avec l'actine musculaire et toutes les actines cytoplasmiques forment des hybrides actifs avec la myosine musculaire (4). Ainsi les protéines cytoplasmiques peuvent avoir une interaction avec les protéines du muscle qui sont connues pour engendrer une force de mouvement. Ceci rend très probable que l'actine et la myosine cytoplasmique elles-mêmes interagissent in vivo pour causer du mouvement.

Finalement, les structures des protéines contractiles du muscle qui sont

si importantes au mécanisme de contraction du muscle se retrouvent également dans les actines cytoplasmiques et la plupart des myosines cytoplasmiques (4). Toutes les actines forment les mêmes filaments en double hélice polarisés et fixent la myosine de la même façon. Toutes les myosines, excepté celles de l'*Acanthamoeba*, forment des filaments épais bipolaires avec des sites actifs pour l'hydrolyse de l'ATP et des sites pour la liaison avec l'actine située aux deux extrémités (4). Des filaments bipolaires de myosine qui ont une interaction avec des filaments unipolaires d'actine pourraient engendrer une force par un mécanisme de glissement de filaments dans des cellules non-musculaires. Toutes les propriétés biochimiques mesurées des actines et myosines cytoplasmiques sont en accord avec cette suggestion. La force qui engendre la contraction dans l'*Acanthamoeba* pourrait aussi être causée par des filaments d'actine qui glissent l'un sur l'autre liés par des molécules de myosine individuelle ou des petits oligomères plutôt que par des agrégats de myosine filamentaire.

Il est à remarquer que d'autres ont fait des suggestions semblables sur des bases théoriques ou se sont basés sur les propriétés des protéines contractiles cytoplasmiques qu'ils étudiaient (4). Sur la base des considérations qui précèdent, il nous a paru utile de commencer une étude dans le but d'établir si les cellules cancéreuses qui exercent une activité invasive contiennent des quantités de protéines contractiles augmentées par rapport aux cellules normales correspondantes.

Matériel et méthodes :

Tissus : Les échantillons ont été sélectionnés parmi notre matériel de biopsie d'urgence et comprenait pour le sein, des carcinomes canaliculaires

invasifs avec fibrose (6 cas) et sans fibrose (7 cas). Le matériel de contrôle était constitué de tissu mammaire normal provenant de mammoplastie (3 cas).

Immunofluorescence : Les anticorps employés étaient

1) des anticorps anti-actine (AAA) obtenus chez 2 patients souffrant d'une hépatite chronique agressive (5). Leurs titres testés sur du muscle lisse de l'intestin de rat étaient 1/1280 et 1/640 respectivement.

2) des anticorps produits expérimentalement chez le lapin en injectant de l'actine purifiée provenant de l'utérus humain, de l' α -actinine, de la méromyosine lourde et la méromyosine légère, de la myosine et de la tropomyosine (6,7). Leurs titres testés sur du foie, de l'estomac et du rein de rat allaient de 1/10 à 1/100. Des coupes au cryostat de 4 μ d'épaisseur ont été traitées avec les sérums contenant les anticorps suivis par, soit une fraction de γ -globulines (IgG) de sérum de chèvre (liées à la fluorescéine) dirigée contre les γ -globulines humaines, soit par une fraction d'IgG de mouton dirigée contre les γ -globulines de lapin, dans le cas du sérum de lapin. Cette technique indirecte a souvent eu comme conséquence une forte fluorescence de fond quand les sérums AAA (humains) étaient employés. Pour éviter cette difficulté, la fraction de γ -globuline du sérum AAA a été isolée par précipitation avec une solution à saturation de 33% de sulfate d'ammonium et ensuite conjuguée avec la rhodamine ou la fluorescéine (8).

Des coupes adjacentes à celles colorées par l'immunofluorescence étaient toujours colorées à l'hématoxyline - éosine pour faire une corrélation entre la morphologie et des cellules et les protéines contractiles.

Pour contrôler la spécificité des différents anticorps, les anti-sérums ont été incubés avec de l'actine purifiée provenant des plaquettes (thrombosthénine-A, qui nous a été aimablement fournie par le Professeur E.F.Lüscher, Institut Théodore Kocher, Université de Berne) ou du muscle strié (9), de la

myosine, de la méromyosine légère et lourde de l'utérus humain(10). Des tests effectués sur les tissus normaux de rat et de lapin (estomac et intestin) montrent que la coloration de chaque anticorps n'a été abolie qu'après incubation avec la protéine employée pour l'immunisation. La coloration de l'AAA humain n'était abolie qu'après incubation soit avec de l'actine provenant des plaquettes ou du muscle strié.

Au microscope électronique : Des petits cubes de tissus étaient fixés dans du glutaraldehyde à 3% dans un tampon de cacodylate à pH 7,2 à 7,4 post fixés dans une solution 1% de OsO_4 dans un tampon de collidine à pH 7,2 à 7,3 déshydratés dans de l'alcool, inclus dans de l'Epon 812 et examinés avec un microscope électronique Philips 300.

Partie expérimentale de l'expérience; résultats

Glande mammaire : Les tissus non cancéreux ne se coloraient pas avec le sérum normal (fig. 1a), par contre, une fluorescence intense était présente à la périphérie des canaux et des canalicules après incubation avec tous les anti-sérums(Fig.1b,c,d). Cette localisation correspond aux cellules myoépithéliales comme l'ont montré les coupes de contrôle adjacentes colorées à l'hématoxyline - éosine. La partie intérieure des canaux et des canalicules (qui correspondait aux cellules épithéliales) n'était que faiblement positive, en particulier la portion des cellules proche de la lumière.

Dans les coupes traitées avec un anticorps contenant chaque sérum préalablement incubé séparément avec chaque proépine utilisée pour l'immunisation soit avec des plaquettes purifiées, soit avec de l'actine provenant du muscle strié dans les cas des anticorps anti-actine, aucune fluorescence n'était visible.

Les cellules cancéreuses étaient fortement positives pour l'actinine, la myosine (Fig. 1f), l'actine (Fig. 1e, g) et la méromyosine lourde, mais étaient négatives pour la tropomyosine (Fig. 1h) et ne se coloraient pas avec le sérum normal. La coloration était cytoplasmique, plus intense autour des noyaux (ces derniers ne prenaient pas la coloration) et tout particulièrement sous la membrane cellulaire. Ce schéma de localisation se répétait quand les cellules malignes se trouvaient dans les canaux galactophores et quand elles se présentaient sous la forme d'amas malins entourés par du tissu conjonctif.

Quand les cellules cancéreuses étaient intracanaliculaires, la coloration de la partie périphérique des canaux (qui correspondait aux cellules myoépithéliales) était absente à plusieurs endroits. Dans des carcinomes squirreux typiques, invasifs, de nombreuses cellules allongées étaient positives pour toutes les protéines contractiles (Fig. 1g). Ces cellules étaient faciles à distinguer des cellules tumorales qui apparaissent plus ovalaires; donc ces cellules allongées représentaient probablement des fibroblastes réactifs (myofibroblastes). Dans les coupes traitées avec des anticorps contenant des sérums dont chacun avait été préalablement incubé avec la seule protéine employée pour l'immunisation ou avec de l'actine provenant de plaquettes purifiées ou du muscle strié dans le cas du AAA, aucune fluorescence n'était visible.

A l'examen au microscope électronique, les tissus normaux n'étaient pas différents des descriptions précédentes de canaux et de canalicules galactophores qui n'avaient pas d'activité sécrétrice (16) (Fig. 2). Les cellules myoépithéliales contenaient des amas de microfilaments (40-80 Å de diamètre) avec des filaments plus épais (d'un diamètre de 100-120 Å) éparpillés entre eux. Dans ces amas, l'on trouvait plusieurs zones denses semblables

aux lieux d'attachement du muscle lisse. Dans des cellules épithéliales, de rares microfilaments étaient localisés à la périphérie des cellules bordant la lumière (Fig.3), et parfois étaient présentes dans des projections microvilleuses. Dans les cellules cancéreuses, qu'elles soient intracanaliculaires ou envahissent, des amas de micro-filaments (de 40 à 80 Å de diamètre) étaient présents (Fig.4). Néanmoins, ces filaments étaient plus souvent organisés en un fin réseau dans lequel il était difficile de mettre en évidence des filaments uniques, à un grossissement faible. Lorsque l'on passait à un plus fort grossissement, il était possible d'observer la présence de micro-filaments d'un diamètre de 40 à 80 Å ainsi que des filaments d'un diamètre de 100 à 120 Å (Fig. 5).

Ce réseau était visible dans la zone périnucléaire et particulièrement à la périphérie de la plupart des cellules tumorales. Il était évident dans des prolongements semblables à des pseudopodes qui se trouvaient dans des cellules sans membrane basale et étaient directement en contact avec des fibres du tissu conjonctif (Fig.6). Parfois, on pouvait remarquer que ces cellules étaient en contact avec d'autres cellules tumorales au moyen de complexes jonctionnels; elles semblaient représenter la partie la plus invasive d'un amas de cellules tumorales.

Discussion :

Dans les tumeurs du sein étudiées, les cellules malignes contiennent une quantité accrue de protéines contractiles, organisées en un réseau de micro-filaments.

La présence de micro-filaments a été décrite précédemment dans plusieurs cellules cancéreuses, notamment de la peau (12,13) et du sein (14), mais la

corrélation entre la présence de micro-filaments et la présence de protéines contractiles décelées au moyen de l'immunofluorescence n'avait pas été faite.

Il est maintenant admis que de nombreuses cellules eucaryotiques contiennent une quantité variable de protéines contractiles, l'activité de ces dernières semblant être liée à des fonctions telles que la locomotion, le transport intracellulaire ou l'endocytose et l'exocytose (4). Les cellules dont les filaments intracytoplasmiques augmentent considérablement à la suite des modifications de leur microenvironnement ont été décrites : il s'agit de cellules épidermiques pendant la guérison d'une plaie ouverte (15) ou pendant la production expérimentale de tumeurs malignes (16); des fibroblastes du tissu de granulation ou myofibroblastes (17); des hépatocytes pendant la régénération après hépatectomie partielle (18), ou après traitement avec de petites quantités de phalloïdine (un des poisons de l'*Amanita Phalloïdes* (19)); et les cellules endothéliales de l'aorte pendant les premiers stades de l'hypertension (20). Dans tous ces cas, on peut observer une coloration plus intense des anticorps dirigés contre les protéines contractiles, particulièrement contre les anticorps anti-actine. Des filaments contenant de l'actine ont été démontrés en association avec des membranes plasmiques (21, 23, 24), mais la relation fonctionnelle entre les protéines contractiles périphériques du cytoplasme et la membrane plasmique sont encore inconnues. La localisation en périphérie de ces filaments est un argument en faveur de l'idée que ces protéines participent à des fonctions impliquant le plasmalemma. Dans tous les échantillons que nous avons examinés, la coloration à l'immunofluorescence était plus marquée dans les zones de croissance de la tumeur et dans les groupes isolés de cellules métastatiques autour des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Il serait tentant de spéculer

que l'augmentation des protéines contractiles dans les cellules cancéreuses humaines est en relation avec la motilité augmentée de ces dernières et donc de leur tendance à envahir. Cette possibilité est renforcée par la trouvaille constante par l'immunofluorescence aussi bien qu'à la microscopie électronique d'une quantité accrue de protéines contractiles dans les cellules cancéreuses par opposition aux cellules non tumorales.

Par ailleurs, il faut souligner que l'augmentation de protéines contractiles dans une cellule ne prouve pas nécessairement une tendance à la transformation maligne. Comme il a été dit plus haut (17), des cellules épidermiques qui croissent sur une plaie ouverte, contiennent une quantité accrue de protéines contractiles, quand on les compare avec l'épiderme normal.

La seule protéine contractile dont la quantité n'est pas accrue dans les cellules cancéreuses pour autant que l'on puisse en juger par l'immunofluorescence, est la tropomyosine. En effet, alors que les anticorps anti-tropomyosine coloraient fortement les cellules myoépithéliales dans le sein normal, dans les cellules tumorales que nous avons étudiées, nous n'avons pas retrouvé de coloration anti-tropomyosine. On sait que la tropomyosine est une composante de cellules musculaires et non-musculaires (4). Nous ne savons pas si le fait de ne pas pouvoir démontrer la présence de tropomyosine dans les cellules cancéreuses avec notre technique d'immunofluorescence est dû à une quantité plus faible de cette protéine dans les cellules cancéreuses ou à une différence des propriétés antigéniques de la tropomyosine tumorale.

Des études précédentes ont montré que des cellules, transformées in vitro par des virus oncogènes, contiennent une quantité diminuée de micro-filaments intracytoplasmatiques (25, 26, 27), ainsi qu'une distribution altérée (30, 31) de protéines contractiles quand on les compare à leurs équivalents normaux. Il est difficile de comparer les propriétés des cellules tumorales dans un

organisme avec un modèle expérimental in vitro ; de plus, la présence de quantité importante de micro-filaments a été décrite dans les cellules tumorales expérimentales (28) et humaines (29, 30, 31, 32, 33, 34). Ozello (35) a estimé que leur présence était une caractéristique importante du carcinome du sein.

Une plus grande documentation sera nécessaire pour clarifier le rôle des protéines contractiles dans différentes tumeurs malignes ainsi que dans des situations où les cellules sont en voie de transformation maligne. De toute façon, l'intensité de la coloration à l'immunofluorescence des cellules tumorales est en corrélation directe avec la présence de micro-filaments, tels qu'ils ont été vus au microscope électronique. Cette trouvaille pourrait représenter une propriété d'une importance potentielle pour évaluer les caractéristiques d'une croissance maligne.

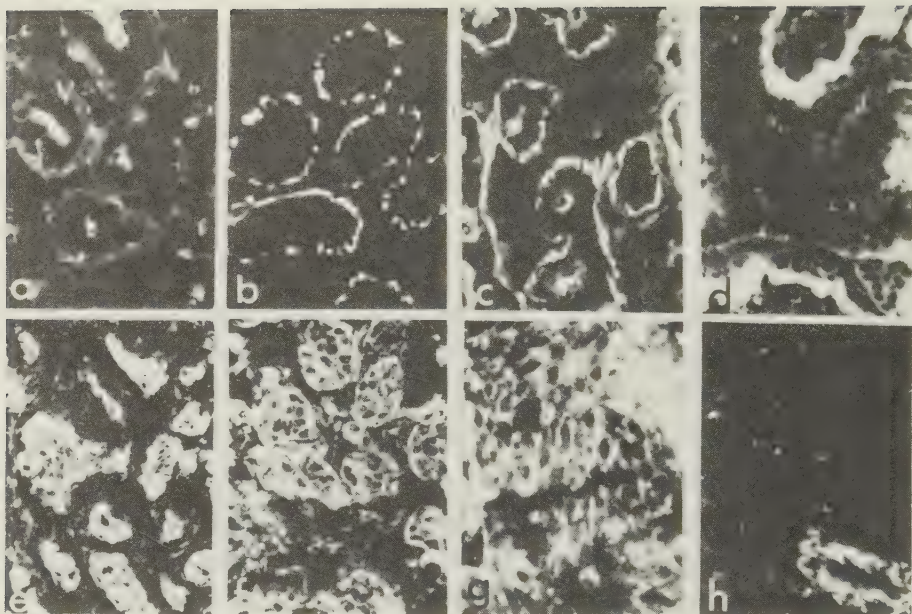


FIGURE 1 (400 x).

a) acini d'une glande mammaire normale incubée premièrement avec un sérum humain normal, suivi par un sérum de chèvre, contenant des anticorps contre les IgG humaines, conjugué à la fluorescéine. Pas de fluorescence visible. A noter le matériel fluorescent non spécifique présent dans la lumière des acini (x 400).

b) acini d'une glande mammaire normale incubée premièrement avec un sérum de lapin contenant des anticorps contre la tropomyosine suivi par un sérum de mouton contenant des anticorps contre les IgG de lapin. La fluorescence est strictement limitée à une bande à la périphérie des acini correspondant aux cellules myoépithéliales (x 400).

c) acini d'une glande mammaire normale incubée premièrement avec un sérum humain contenant des auto-anticorps anti-actine suivi par un sérum de chèvre contenant des anticorps contre les IgG humaines conjugué à la fluorescéine. Ici, la distribution de la coloration est semblable à celle qu'on observe après le sérum anti-tropomyosine. Du matériel fluorescent non spécifique est aussi présent dans la lumière des acini. (x 400).

d) conduit d'une glande mammaire normale traitée comme en c). Ici aussi, la coloration est limitée à la partie périphérique du conduit qui correspond aux cellules myoépithéliales (x 400).

e) carcinome mammaire incubé d'abord avec un sérum de lapin contenant des anticorps anti-actine, suivi par un sérum de mouton contenant des anticorps contre les IgG de lapin conjugué à la fluorescéine. Les amas de cellules tumorales sont positives (x 160)

f) carcinome mammaire incubé d'abord avec un sérum de lapin contenant des anticorps anti-myosine suivi par un sérum de chèvre contenant des anticorps anti-IgG de lapin conjugué avec la rhodamine. La distribution de la coloration est semblable à celle observée après incubation au sérum anti-actine (x 250).

g) carcinome mammaire incubé d'abord avec un sérum humain contenant des anticorps anti-actine suivi par un sérum de chèvre contenant des anticorps contre les IgG humaines conjugué à la fluorescéine. Les cellules tumorales sont colorées surtout à leur périphérie. Les cellules allongées présentent en haut à droite de la figure, sont probablement des myofibroblastes (x 400).

h) carcinome mammaire incubé d'abord avec un sérum de lapin contenant des anticorps contre la tropomyosine suivi par un sérum de mouton contenant des anticorps contre les IgG de lapin conjugué à la fluorescéine. La coloration est limitée à la paroi des petits vaisseaux, tandis que les cellules tumorales sont négatives (x 400).

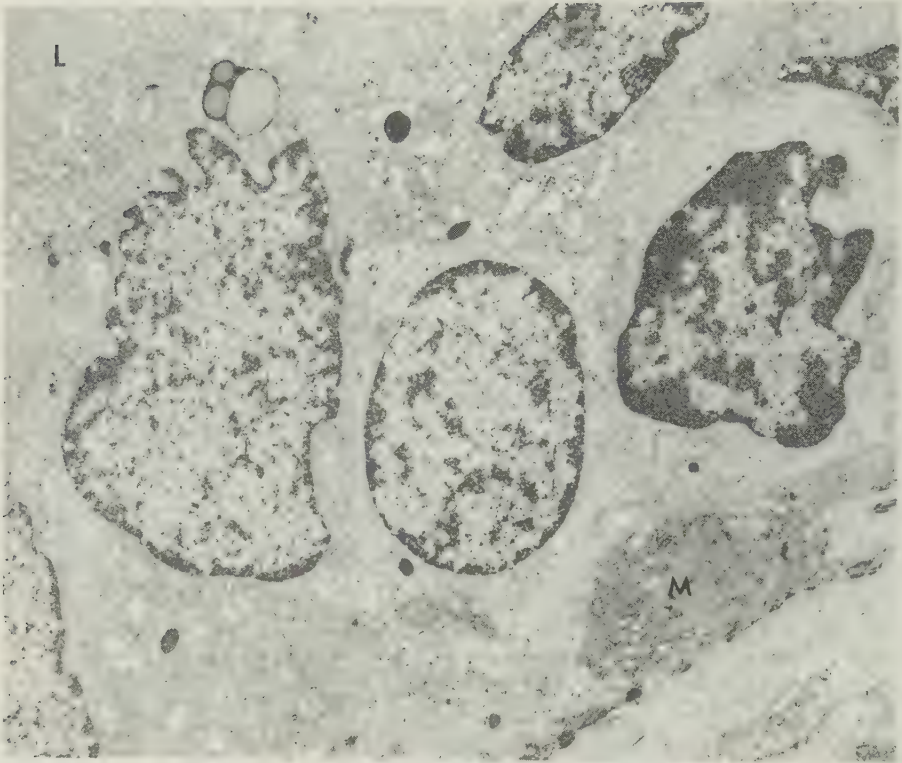


FIGURE 2 (7000 x)

Micrographie électronique à faible grossissement qui montre l'épaisseur de la paroi d'un acinus de la glande mammaire. La lumière (L) est en haut à gauche. Les cellules épithéliales contiennent des noyaux ovales et des granules de sécrétion. Les cellules myoépithéliales (M) sont situées près de la membrane basale (x 7000).

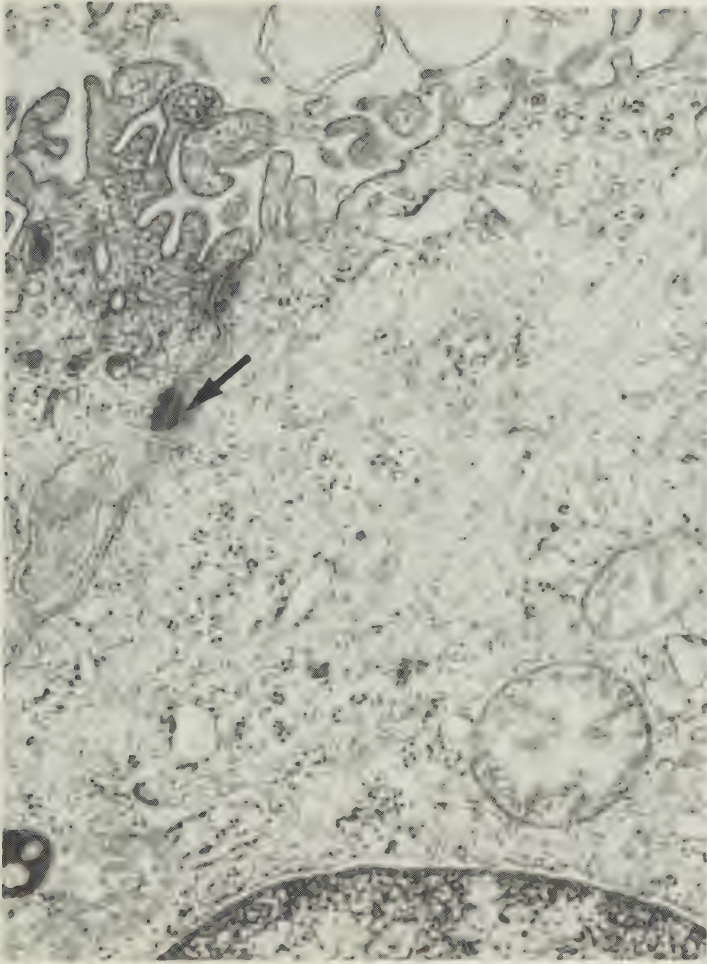


FIGURE 3 (34 800 x)

Détail des deux cellules épithéliales d'un acinus de glande mammaire normale; le cytoplasme contient quelques microfilaments surtout en périphérie des cellules dans les microvillosités. A noter de nombreux ribosomes, les mitochondries et la jonction intercellulaire (flèches) de type *Macula adherens*. (x 34 800)

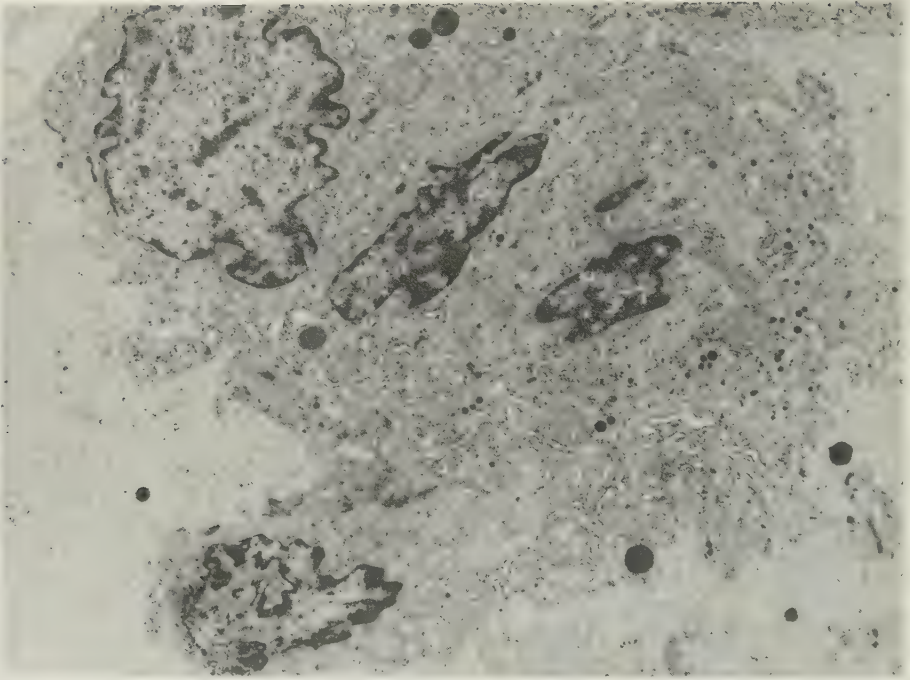


FIGURE 4 (6400 x)

Micrographie électronique à faible grossissement d'un groupe de cellules d'un carcinome mammaire. Les cellules sont entourées de fibres collagènes et de substance fondamentale.

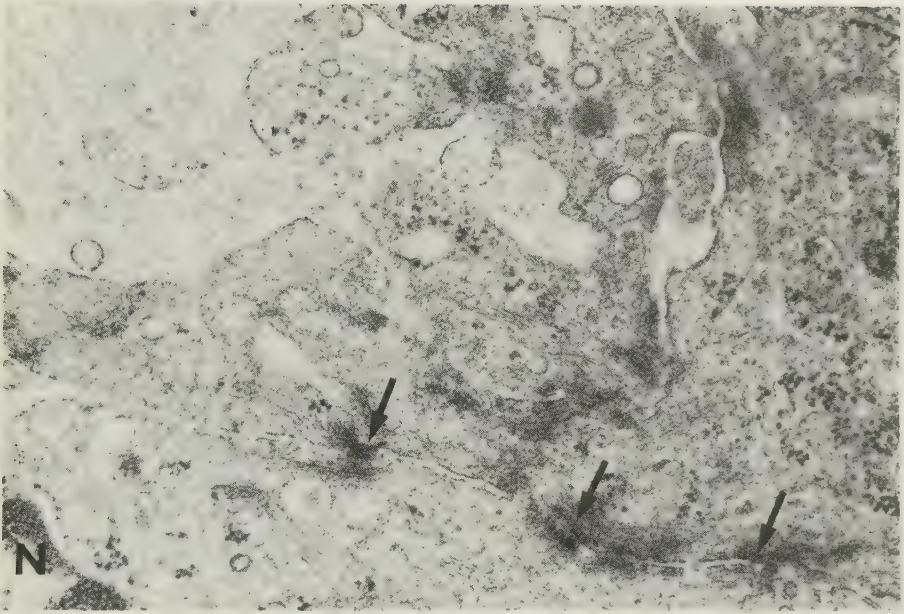


FIGURE 5 (36 700 x)

A un grossissement plus fort, le cytoplasme des cellules tumorales est composé surtout en périphérie, presque exclusivement de microfilaments. A noter les jonctions cellulaires (flèches) entre deux cellules cancéreuses.

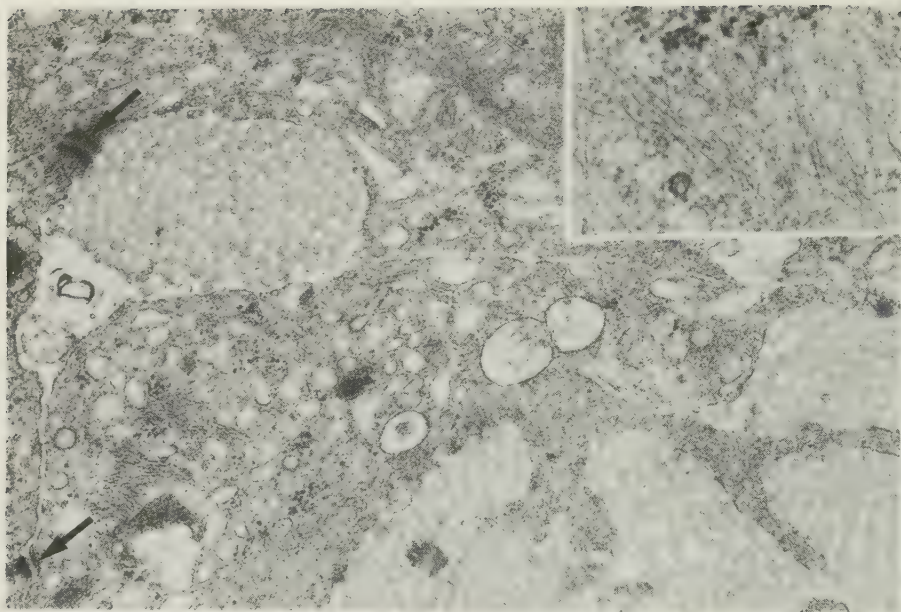


FIGURE 6 (20 500 x)
(inset : 43 100 x)

Partie périphérique du cytoplasme de cellules d'un carcinome mammaire. A noter l'absence de membrane basale entre la membrane cellulaire de la cellule tumorale et les fibres collagènes. Deux complexes jonctionnels (flèches) sont visibles. La partie périphérique du cytoplasme et les prolongements cellulaires, qui probablement correspondent à la portion envahissante de la cellule, sont composés presque exclusivement de microfilaments (x 43 100).

BIBLIOGRAPHIE

- 1) ABERCROMBIE M., AMBROS E. J. : The surface properties of cancer cells : A review. *Cancer Res.*, 22 : 525-548, 1962.
- 2) ROSENAU W. : The nature and mechanism of metastasis. *Oncology*, 24 : 21-25, 1969
- 3) WOOD S. Jr., BAKER R. R., MARZOCCHI B. : Locomotion of cancer cells in vivo compared with normal cells. *Mechanisms of invasion in cancer*. Edited by P. Denoix, Berlin, Springer-Verlag, 1967, pp. 26-30.
- 4) POLLARD T. D. and WEIHING R. R. : Cytoplasmic actin and myosin and cell movement. *CRC Critical Review of Biochemistry* Vol. 2. Edited by G. D. Fassman. Cleveland, Chemical Rubber Company, 1974, pp 1-65.
- 5) GABBIANI G., RYAN G. B., LAMELIN J. P., VASSALLI P., MAJNO G., BOUVIER C. A., CRUCHAUD A., LUSCHER E. F. : Human smooth muscle antibody : Its identification as antiactin antibody and a study of its binding to "nonmuscular" cells. *Am. J. Pathol.* 72 : 473-488, 1973.
- 6) TRENCH P., SNEYD P., HOLBOROW E. J. : Immunofluorescent tracing of smooth muscle contractile protein antigens in tissues other than smooth muscle. *Clin. Exp. Immunol.*, 16 : 125-136, 1974.
- 7) HOLBOROW E. J., TRENCH P. S., DORLING J. and WEBB J. : Demonstration of smooth muscle contractile protein antigens in liver and epithelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 254 : 489-504, 1975.
- 8) CEBRA J. J. and GOLDSTEIN G. : Chromatographic purification of tetraethylrhodamin-immune globulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit γ -globulin polypeptide chains. *J. Immunol.*, 95 : 230-245, 1965.
- 9) PROBST E. and LUSCHER F. : Studies on thrombosthenin-A, the actin-like moiety of the contractile protein from blood platelets. I. Isolation, characterization and evidence for two forms of thrombosthenin-A. *Biochim. Biophys. Acta*, 278 : 577-584, 1972.

- 10) SPUDICH J. A. and WATT S. : The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.*, 246 : 4866- 4871, 1971.
- 11) SERAYDARIAN K., BRISKEY E. J. and MOMMAERTS W. F. : The modification of actomyosin by α -actinin. I. A survey of experimental conditions. *Biochim. Biophys. Acta*, 133 : 399-411, 1967.
- 12) BLOOM W. and FAWCETT A. W. : A Textbook of Histology, Ninth edition. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1968, p. 479.
- 13) ZELICKSON A. S. : An electron microscope study of the basal cell epithelioma. *J. Invest. Dermatol.*, 39 : 183-187, 1962.
- 14) REIDBORD H. E., WECHSLER H. L. and FISHER E. R. : Ultrastructural study of basal cell carcinoma and its variants with comments on histogenesis. *Arch. Dermatol.*, 104 : 132-140, 1971.
- 15) FISHER E. R., MCCOY M. M. II and WECHSLER H. L. : Analysis of hispopathologic and electron microscopic determinants of keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Cancer*, 29 : 1387-1397, 1972.
- 16) LIGHTTIGER B., MacKay B. and TESSMER C. F. : Spindle-cell variant of squamous carcinoma : A light and electron microscopic study of 13 cases. *Cancer*, 26 : 1311-1320, 1970.
- 17) GABBIANI G., HIRSCHER B. J., RYAN G. B., STATKOV P. R. and MAJNO G. : Granulation tissue as a contractile organ : A study of structure and function. *J. Exp. Med.*, 135 : 719-734, 1972.
- 18) OZZELLO L. : Ultrastructure of the human mammary gland. *Pathol. Annu.*, 6 : 1-59, 1971.
- 19) MALECH H. L. and LENTZ T. L. : Microfilaments in epidermal cancer cells. *J. Cell Biol.*, 60 : 473-482, 1974.
- 20) GABBIANI G. and RYAN G. B. : Development of a contractile apparatus in epithelial cells during epidermal and liver regeneration. *J. Submicrosc. Cytol.*, 6 : 143-157, 1974.

- 21) GABBIANI G., MONTESANO R., TUCHWEBER B., SALAS M. and ORCI L. : Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rats hepatocytes. *Lab. Invest.*, 33 : 562-569, 1975.
- 22) GABBIANI G., BADONNEL M. C., RONA G. : Cytoplasmic contractile apparatus in aortic endothelial cells of hypertensive rats. *Lab. Invest.*, 32 : 227-234, 1975.
- 23) POLLARD T. D. and KORN E. D. : Electron microscopic identification of actin associated with isolated amoeba plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 248 : 448-450, 1973.
- 24) TILNEY L. G., CARDELL R. R. Jr. : Factors controlling the reassembly of the microvillous border of the small intestine of the salamander. *J. Cell. Biol.*, 47 : 408-422, 1970.
- 25) GRUENSTEIN R., RICH A. and WEIHING R. R. : Actin associated with membranes from 3T3 mouse fibroblast and HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 64 : 223-234, 1975.
- 26) McNUTT N. S., CULP L. A. and BLACK P. H. : Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. II. Ultrastructural study. *J. Cell Biol.*, 50 : 691-708, 1971.
- 27) McNUTT N. S., CULP L. A. and BLACK P. H. : Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. IV. Microfilament distribution and cell shape in untransformed, transformed and revertant Balb/c 3T3 cells. *J. Cell Biol.*, 56 : 412-428, 1973.
- 28) DERMER D.G., LUE J. and NEUSTEIN H. B. : Comparison of surface material, cytoplasmic filaments, and intercellular junctions from untransformed and two mouse sarcoma virus-transformed cell lines. *Cancer Res.*, 34 : 31-38, 1974.
- 29) OSTLUND R.E., PASTAN I. and ADELSTEIN R. S. : Myosin in cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 249 : 3903-3907, 1974.
- 30) POLLACK R., OSBORN M. and WEBER K. : Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 72 : 994-998, 1975.

- 31) WICKUS G., GRUENSTEIN E., ROBBINS P. W. and RICH A. : Decrease in membrane-associated actin of fibroblasts after transformation by Rous sarcoma virus. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 72 : 746-749, 1975.
- 32) GABBIANI G., KAYE G. I., LATTES R. and MAJNO G. : Synovial sarcoma. Electron microscopic study of a typical case. Cancer, 28 : 1031-1039, 1971.
- 33) FU Y. S., GABBIANI G., KAYE G.I. and LATTES R. : Malignant soft tissue tumors of probable histiocytic origin (malignant fibrous histiocyctomas): general considerations and electron microscopic and tissue culture studies. Cancer, 35 : 176-198, 1975.
- 34) OZZELLO L. : Electron microscopic study of functional and disfunctional human mammary glands. J. Invest. Dermatol., 63 : 19-26, 1974.
- 35) MURRAY J. M. and WEBER A. : The cooperative action of muscle protein. Sci. Amer., 230 : 59-71, 1974.
- 36) DURHAM A. C. H. : A unified theory of the control of actin and myosin in nonmuscle movements. Cell, 2 : 123-136, 1974.
- 37) JOHNSON G. D., HOLBOROW E. J. and GLYNN L. E. : Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. Lancet, 2 : 878-879, 1965.

